Polarographische Methoden zur Bestimmung von Nucleinsäuren-Spaltstücken

Kurzfassung der

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Klaus Bronstert
aus Hagen i. W.

Polarographische Methoden zur Bestimmung von Nucleinsäuren-Spaltstücken

Kurzfassung der

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Klaus Bronstert
aus Hagen i. W.

Tag der mündl. Prüfung:

10. Mai 1954

In der vorliegenden Arbeit werden Methoden beschrieben, die es ermöglichen, mit Hilfe der Polarographie und der U.-V.-Meßtechnik in kleinen Substanzmengen die Basen- und Phosphorgehalte von Nucleinsäuren mit einer Genauigkeit von ± 2-3% zu bestimmen und praktisch vollkommen zu erfassen. Es wird die Zusammensetzung von Desoxyribonucleinsäure aus Kalbstymus angegeben.

I n h a l t

Seite

I. Einleitung

1.) Aufbau und Zusammensetzung von Nucleinsäuren 1
2.) Bemerkungen zur Analytik von Nucleinsäuren 2
3.) Ziele und Ergebnisse 2

II. Analytische Methodik

1.) Bestimmung der Purin- und Pyrimidinbasen, der Desoxyribose und des Phosphors 3
(Adenin S.3, Guanin S.4, Uracil S.5, Zytosin S.5, Thymin und Methylzytosin S.5, Bestimmung der Pyrimidinbasen nebeneinander S.5, Desoxyribose S.5, Phosphor S.5)

2.) Die Hydrolyse von Polynucleotiden und die Isolierung der Purinbasen 6
(Die Isolierung der Purinbasen über die Silbersalze S.6, über die Hydrochloride S.6, die Freilegung der Pyrimidinbasen S.6)

3.) Zusammenfassende Beschreibung des Analysenganges 6

III. Die Zusammensetzung von Desoxyribonucleinsäure aus Kalbstymus 7

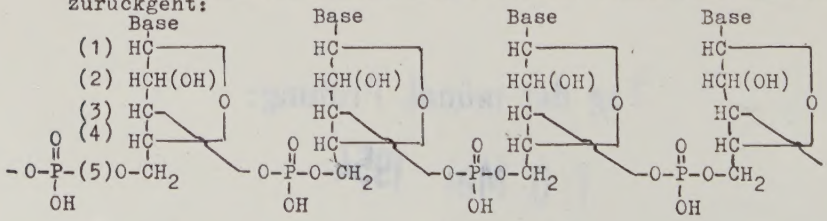
IV. Literaturverzeichnis 8

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Einleitung

Aufbau und Zusammensetzung von Nucleinsäuren.

Die Nucleinsäuren, kompliziert aus Bausteinen mehrerer Körperklassen zusammengesetzte Stoffe, haben eine zentrale Stellung bei der Abwicklung der Lebensvorgänge in der Zelle. Als Komplexe mit basischen Eiweißstoffen bilden Desoxyribonucleinsäuren (DNS) einen Hauptbestandteil der Chromosomen, während sich im Zellplasma Ribonucleinsäuren (RNS) in den Mitochondrien und Mikrosomen, die u.a. Träger der Zellathmung sind, stark angereichert finden. Seit ihrer Entdeckung durch F.Miescher (1870, Lit.20) wurden viele Untersuchungen zur Konstitutionsaufklärung angestellt. Dennoch ist heute wegen des komplizierten Aufbaues erst ihre grobe Struktur bekannt, die durch das folgende Bild wiedergegeben wird, das auf Untersuchungen von F.Miescher, W.Kossel, P.A.Levene und H.Steudel zurückgeht:



Nucleinsäuren bestehen also aus äquimolaren Mengen Basen, Kohlehydrat und Phosphorsäure. Wichtige Merkmale der beiden anfangs genannten Klassen von Nucleinsäuren sind außer der Verschiedenheit der Bausteine des Kohlehydratskelettes (Ribose und Desoxyribose), die im Namen ihren Ausdruck findet, die folgenden:

Desoxyribonucleinsäuren enthalten als Basen Adenin, Guanin, Uracil und Zytosin, nach neueren Untersuchungen auch Methylzytosin.

Ribonucleinsäuren Adenin, Guanin, Uracil und Zytosin.

Desoxyribonucleinsäuren haben ein Molekulargewicht von 100 000 - 1 000 000 und sind unverzweigt.

Ribonucleinsäuren haben ein Molekulargewicht von 10 000 - 20 000 und bilden verzweigte Ketten (Todd, Lit.24).

2.) Bemerkungen zur Analytik von Nucleinsäuren.

Zur Kennzeichnung und Charakterisierung von Nucleinsäuren sind die molaren Verhältnisse der Basen zueinander und zur Phosphorsäure wichtig und wertvoll, da die meisten der in der klassischen Chemie benutzten Kriterien nicht anwendbar sind. Die ersten analytischen Untersuchungen stammen von P.A.Levene und H.Steudel (Lit.16,22), und bis in die neueste Zeit kamen Veröffentlichungen über Analysenergebnisse und Methoden heraus. Eine Zusammenstellung der Literatur bis 1951 findet sich bei F.G.Fischer und H.Mangold (Lit.17). Von diesem Zeitpunkt an änderte sich an der Methodik kaum noch etwas. Nach Hydrolyse der Nucleinsäuren mit z.B. 100%iger Ameisensäure oder 75%iger $HClO_4$ (Lit.5,19,28) wird das erhaltene Basen-, Nucleosid- und/oder Nucleotidgemisch papierchromatigraphisch (z.B. Lit.8,19,28), seltener auch chromatographisch (Lit.17) oder an Ionenaustauschern (Lit.29) oder durch Fällungsreaktionen (Lit.7,14) aufgetrennt. Von den Methoden zur Bestimmung der getrennten Bestandteile erlangte in der Neuzeit große Bedeutung die Ausnützung der starken U.V.-Absorption der Purine und Pyrimidine bzw. ihrer Derivate im BECKMAN-U.V.-Spektrophotometer, wodurch quantitative Analysen möglich waren (Lit.7,10,18). Daneben wurden zur Bestimmung ausgenützt die Komplexsalze der Basen (Lit.21,30), die Oxydierbarkeit der Nucleoside und Nucleotide (Lit.3), der Phosphorgehalt der Nucleotide (Lit.4), die spezifische Wirkung auf Kulturen bestimmter Mikroorganismen (Lit.13), um nur einige zu nennen. F.G.Fischer und H.Mangold arbeiteten im hiesigen Institut eine Basenbestimmungsmethode aus, bei der eine vorherige Auftrennung des Hydrolysates unnötig ist. Eine Zusammenstellung quantitativer Ergebnisse ist in Tabelle S. 8 gegeben.

Alle Untersuchungen quantitativer Natur haben nur einen beschränkten Wert, solange nicht die Bestimmung der Basen mit einer ausreichenden Genauigkeit möglich ist. So ist es sinnlos, Basenverhältnisse zu errechnen, wenn nur zwischen 75 und 95% der Gesamtbasen (vergl.Tab.S.8) bezogen auf den Phosphorgehalt analytisch erfaßt werden, bei einer Fehlergrenze der in neueren Veröffentlichungen meist angewandten papierchromatographischen Verfahren von $\pm$ 10 - 20% (Lit.7,19,28). Wenn man sieht, daß Hydrolysenmethoden (z.B. eine Hydrolyse mit Ameisensäure bei 175°, Lit.5,28 oder mit 72%iger Perchlorsäure, Lit.19) und Trennungsmethoden (z.B. die Abtrennung der Purine über die Silbersalze, Lit.14) nicht kritisch genug untersucht wurden, erscheinen die oft beträchtlich von einander abweichenden Ergebnisse verschiedener Autoren für die gleiche Nucleinsäure verständlich. Diese Differenzen schienen uns Berechtigung genug, trotz der zahlreichen bestehenden Methoden zur Analyse von Polynucleotiden, den Gegenstand zu bearbeiten.

3.) Ziele und Ergebnisse.

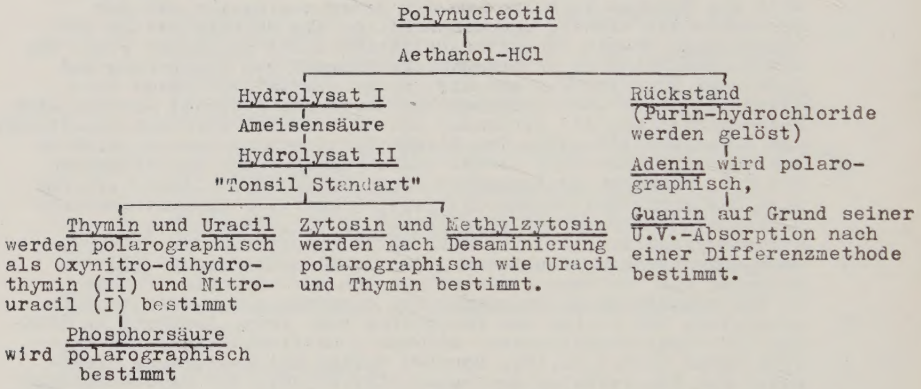
Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel ausgeführt,

1. die in Polynucleotiden enthaltenen Basen möglichst vollständig

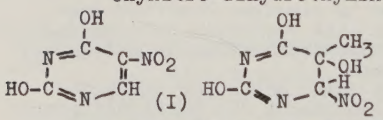
zu erfassen, 2. die Basen mit einer Genauigkeit von mindestens + 2% zu bestimmen, 3. die verwendeten Trennungsmethoden quantitativ zu gestalten, 4. mit geringen Substanzmengen für die Bestimmung auszukommen (100 mg). 5. Die Untersuchungen wurden auf die Bestimmung des Kohlehydratrestes in Desoxyribonucleinsäuren ausgedehnt.

Das Ergebnis war ein Analysengang, der durch das Schema auf S.3 dargestellt wird. Nach einer 50 Min. dauernden Hydrolyse mit Äthanol-HCl bei 100° werden die Purin-hydrochloride quantitativ abgetrennt. In ihrer Lösung wird Adenin polarographisch bestimmt. Aus der U.V.-Absorption der Lösung bei 248 mμ wird durch Subtraktion der errechneten Adeninabsorption die Guaninkonzentration bestimmt.

Die Restlösung der Purine wird von Äthanol-HCl befreit und mit Ameisensäure zur Freilegung der Pyrimidinbasen 2 Std. auf 175° erhitzt. Die Lösung wird nach Verdünnen mit Wasser durch "Tonsil



Standart" (ein saures Al-silikat) filtriert. Im Filtrat werden Thymin und Uracil nach Eindampfen zur Trockne durch Nitrieren in Oxynitro-dihydrothymin (II) und Nitrouracil (I) übergeführt, die sich polarographisch bestimmen lassen. Das Absorptionsmittel enthält das Zytosin und evtl. Methylzytosin. Die Basen werden durch Desaminierung am Adsorptionsmittel durch 20%ige SO_2-gesättigte Schwefelsäure während 60 Std. bei 175° in Uracil und Thymin überführt, die wie oben angegeben bestimmt werden. Die Phosphorsäure wird entweder in einer besonderen Einwaage oder im Filtrat vom "Tonsil Standart" nach der Nitrierung bestimmt.


(I)

(II)

Als Beispiel wurde die Desoxyribonucleinsäure aus Kalbstymus sehr genau untersucht.

Die Methodik erscheint, verglichen mit papierchromatographischen Methoden (z.B .Lit. ?) etwas umständlich. Sie erhält jedoch ihre Berechtigung durch die Zuverlässigkeit ihrer Ergebnisse. Durch die Art der Hydrolyse können die Purinbasen praktisch vollständig isoliert und so eine Gesamtbasenausbeute von annähernd 97% erreicht werden.

Für jede Analyse benötigt man 50-100 mg Substanz. Bei geringeren Ansprüchen an die Genauigkeit kann man jedoch noch Mengen bis herab zu 2 mg analysieren. Die folgenden Ausführungen geben nähere Angaben zur analytischen Methodik.

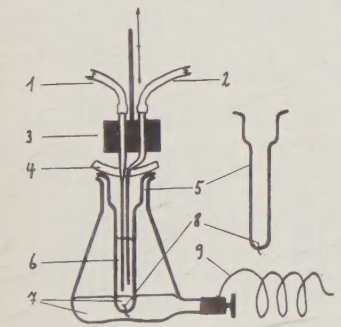
II. Analytische Methodik

1.) Bestimmung der Purin- und Pyrimidinbasen, der Desoxyribose und des Phosphors.

Adenin wurde polarographisch entsprechend den Angaben von F.G.Fischer und H.Mangold (Lit.17) bestimmt. Da jedoch mit weit geringeren Adeninkonzentrationen gearbeitet wurde, war eine Entlüftung der Analysenlösungen unbedingt erforderlich. Es wurde eine Apparatur entwickelt, die eine solche innerhalb einer halben Minute gestattet und zugleich während der Bestimmung die Luft fernhält (Abb.S.4). Um Fehlerquellen zu kompensieren, wurde zu jeder Analyse eine besondere Eichbestimmung gemacht.

Vorschrift zur Bestimmung des Adenins:
1 ccm der Adenin-haltigen Analysenlösung und 5 ccm der Grundlösung (1000 ccm 0,1 n Perchlorsäure + 200 ccm 0,1 $NaClO_4$-Lösung) werden gemischt. Die Adeninkonzentration muß dann zwischen 10^{-3} - 10^{-5} liegen. Etwa 1-1,5 ccm dieser Lösung werden in das Analysengefäß gefüllt, so viel Quecksilber zugegeben, daß der Pt-Draht bedeckt ist. Das Analysengefäß wird in den zugehörigen Erlenmeyerkolben eingehängt und die Halterung mit der Tropfkappillare und der Entlüftungskappillare heruntergeschoben, bis die Gummiplatte auf dem Rand des Analysengefäßes aufliegt. Es wird nun Reinstickstoff durch die Lösung geleitet, bis der Grundstrom konstant, d.h. kein Sauerstoff mehr in der Lösung enthalten ist. Dann wird die Zuleitung des Stickstoffs unterbrochen und das Polarogramm aufgenommen. In gleicher Weise verfährt man mit der Eichlösung, die ungefähr die Konzentration der Analysenlösung haben soll, und errechnet dann die zu bestimmende Adeninmenge.

Abbildung 1.
Entlüftungseinrichtung zur Polarographie.



1. Hg-Tropfkathode
2. N_2-Zuleitung
3. Kapillarenhalterung
4. Gummiplatte (Ventil)
5. Analysengefäß
6. Analysenlösung
7. Bodenquecksilber
8. Platindrahl
9. Anodenstromzuführ.

Darstellung der Eichlösungen:
50 mg Adenin werden scharf getrocknet, in einem mit Chromschwefelsäure gereinigten 100 ccm Meßkolben in destilliertem Wasser gelöst und dieser zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung wird auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Lösungen sind, wenn sie steril und im Dunkeln aufbewahrt werden, monatelang haltbar.

Die Adeninkurve wird, wie Versuche zeigten, durch oberflächenaktive Stoffe gedämpft. Für genaue Analysen sind daher möglichst reine Lösungen anzustreben.

Zur Auffindung analytischer Methoden zur Bestimmung des Guanins wurden viele Untersuchungen durchgeführt. Die Bestimmungsmethode nach H.Mangold erschien uns nämlich zu umständlich und zu empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen.

Anfangs wurde versucht, durch Ausnutzung der Oxydierbarkeit des Guanins zum Ziel zu kommen. Guanin läßt sich nämlich in wäßriger Lösung oxydieren, während sich Adenin gegen Oxydationsmittel mit Ausnahme von Cl und Br resistent zeigte. In der besten gefundenen Methode wurde zu der die Basen (Adenin und Guanin) enthaltenden schwefelsauren Lösung ein Überschuß an $KMnO_4$-Lösung gegeben und das überschüssige Oxydationsmittel nach Zugabe

von Kaliumjodid mit Thiosulfat zurücktitriert, wobei die Bedingungen streng standardisiert werden müssen. Allen oxydimetrischen Bestimmungen ist jedoch gemeinsam, daß sie zu unspezifisch sind.

Von allen anderen untersuchten Methoden war schließlich die Beste eine Kombination der Polarographie mit der U.V.-Absorptionsmessung. Da sich Adenin polarographisch bestimmen läßt, kann man Guanin neben Adenin bestimmen durch Messung der Gesamtabsorption im U.V. und Abziehen der berechneten Absorption des Adenins. Um die Fehlergrenze klein zu halten, ist dabei eine Wellenlänge zu wählen, bei der molare Extinktionskoeffizient des Guanins möglichst groß gegenüber dem des Adenins ist. Leider überlagern sich die beiden Absorptionskurven so, daß keine idealen Bedingungen gegeben sind. Am zweckmäßigsten erschien eine Bestimmung beim Maximum des Guanins bei 248 mμ in saurer Lösung.

Man bringt die Lösung, die zur Bestimmung kommen soll, mit der Grundlösung zur Polarographie des Adenins oder auch mit 0,1 n HCl auf die gewünschte Konzentration und kann in dieser Lösung dann die polarographische Bestimmung des Adenin sowie die Messung der Gesamtextinktion bei 248 mμ mit dem Beckman-U.V.-Spektrophotometer durchführen.

Eine Überprüfung der Methode ergab gute Ergebnisse. Da es sich um eine Differenzbestimmung handelt, wird die Genauigkeit um so größer, je mehr Guanin im Verhältnis zum Adenin vorliegt. Bei einer Mischung von Adenin und Guanin im Verhältnis 1:1 beträgt der durchschnittliche Fehler etwa ± 3-4%. Voraussetzung ist, daß außer Adenin keine anderen im U.V. absorbierende Substanzen vorliegen. Noch 0,05 mg Guanin in 10 ccm Lösung lassen sich bestimmen.

Im Zusammenhang mit diesen Versuchen wurden die molaren U.V.-Absorptionskoeffizienten bei deren Maxima bestimmt, da sich in der Literatur sehr viele von einander differierende Angaben finden. Während der molare Extinktionskoeffizient des Guanins bei 248 mμ und p_H 1 zu 11300 gefunden wurde, wurden für alle Adeninpräparate mit geringen Schwankungen bei p_H 1 für 262 mμ (Maximum) ein Koeffizient von 12750, für 248 mμ ein solcher von 8850 festgestellt. Diese Werte wurden allen Untersuchungen zu Grunde gelegt.

Uracil wurde polarographisch als Nitrouracil bestimmt (H.Mangold, F.G.Fischer, Lit.17). Die Analysenlösung wurde mit dem fünffachen der Grundlösung (16,8g $NaHCO_3$ in 1000 ccm Wasser) gemischt. Das Halbstufen-potiential wurde zu $E_{1/2}$ = 0,87 V gefunden. Eine Entflüftung der Analysenlösung ist bei geringen Konzentrationen notwendig. Für Eichbestimmungen diente Nitrouracil, dessen Lösung monatelang haltbar ist. Die Genauigkeit ist ± 2%. Noch 0,001 mg der Base in 10 ccm Lösung lassen sich gut bestimmen.

Zytosin wird nach seiner Desaminierung und Nitrierung als Nitrouracil bestimmt. Wir führten die Desaminierung zum Unterschied von H.Mangold, der 5 Tage mit verdünnter Schwefelsäure kochte, in einem Bombenrohr bei erhöhter Temperatur durch und konnten so die Dauer auf 24 Std. verkürzen. Die genaue Arbeitsweise wird im Abschnitt II 3 angegeben.

Thymin sowie das 5-Methylzytosin nach seiner Desaminierung zum Thymin analog dem Zytosin werden polarographisch als Oxynitrodihydrothymin wie beim Uracil beschrieben bestimmt. Die zur Nitrierung benützte Salpetersäure muß, um eine vollständige Nitrierung zu erreichen, unbedingt 100%ig sein. Das Halbstufenpotential wurde zu $E_{1/2}$ = 1,74 V gefunden. Als Eichlösungen

wurden, weil Oxynitrodihydrothymin-Lösungen nur sehr begrenzt haltbar sind, Nitrouracil-Lösungen benutzt und dann mit Hilfe der von Forche angegebenen "Methode des Stufenquotienten" (Lit.12) auf Thymin umgerechnet. Zu jeder Bestimmung wurde eine Eichaufnahme gemacht. Die Genauigkeit beträgt ± 2%. Noch 0,002 mg der Base in 10 ccm Lösung lassen sich gut bestimmen.

Die Bestimmung der Pyrimidinbasen nebeneinander ist nur teilweise möglich. So lassen sich Uracil und Thymin leicht nebeneinander polarographisch bestimmen, da die Reduktionspotentiale beträchtlich auseinander liegen. Gleiches gilt nach ihrer Desaminierung für Zytosin und Methylzytosin. Liegen jedoch z.B. Uracil und Zytosin oder Thymin und Methylzytosin oder 3 oder alle 4 Basen nebeneinander vor, so ist vor der Bestimmung eine Trennung notwendig, da sowohl Zytosin wie Uracil, Methylzytosin wie Thymin als Nitrouracil bzw. Oxynitrodihydrothymin bestimmt werden. Diese gelingt durch Filtration der sauren, die Basen enthaltenden Lösung durch "Tonsil Standart". Während die Aminoverbindungen restlos zurückgehalten werden, finden sich Uracil und Thymin restlos im Filtrat. Die letzteren werden in bekannter Weise bestimmt.

Schwierigkeiten bereitete zunächst die Bestimmung der adsorbierten Basen. Sie wurden schließlich dadurch umgangen, daß eine Desaminierung der Basen am Adsorbens gelang. Diese wird mit einer SO_2-gesättigten, 20%igen Schwefelsäure im Bombenrohr bei 170-175° während 24 Std. vollständig. Man filtriert vom Adsorbens, und kocht zur Entfernung der Schwefelsäure und der gelösten anorganischen Salze, mit Bariumkarbonat. Die neutrale Lösung wird filtriert und die im Filtrat enthaltenen Basen in bekannter Weise bestimmt. Beleganalysen zeigten die Zuverlässigkeit der Methode.

Desoxyribose ließ sich trotz vieler darauf verwandter Mühen nicht quantitativ bestimmen.

Die Phosphorsäure wurde nach der UHL-STERNschen Methode (Lit.23,25) in einer von uns modifizierten Form für Mikroeinwaagen bestimmt. Die Methode beruht auf einer Fällung der enthaltenen Phosphorsäure mit Ammonmolybdat. Die Bestimmung wird durch die Gegenwart oxydierender Stoffe nicht gestört, wodurch diese im Verlauf des in II 3 beschriebenen Analysenganges möglich ist und die bisher notwendige umständliche Mineralisierung entfällt.

1,2,3 und 4 ccm einer Standartphosphorlösung (50 mg P/1000 ccm) werden in 25 ccm Bechergläschen auf dem Wasserbad zur Trockne gedampft mit je 1 ccm HNO_3 (125 ccm konz. HNO_3 + 180 ccm H_2O) versetzt und mit 15 ccm Ammonnitrat (400 g/L) in einen 25 ccm Kolben überführt. Ebenso verfährt man mit den phosphorhaltigen Analysenlösungen. Die zur Bestimmung kommende Flüssigkeitsmenge soll zwischen 0,05 und 0,2 mg P enthalten. Man versetzt das Gemisch bei 35° mit 2 ccm einer Ammonmolybdatlösung (7,6g Ammonmolybdat + 300 g Ammonnitrat / 1000 ccm) und hält 15 Min. bei dieser Temperatur. Dann füllt man mit der Ammonnitrat-Lösung zur Marke auf und polarographiert nach einigen Std. Aus den Testbestimmungen mit Hilfe einer Eichkurve den Phosphorgehalt der Analysenlösungen.

Die Bestimmung erreicht eine Genauigkeit von ± 2%. Die Gegenwart größerer Mengen mehrwertiger Ionen, insbesondere SO_4'', ist zu vermeiden, da diese die Fällung des Phosphor-Ammonmolybdates teilweise oder ganz verhindern.

2.) Die Hydrolyse von Polynucleotiden und die Isolierung der Purinbasen.

Da wir für unsere Adenin- und Guaninbestimmung möglichst reine Lösungen brauchten, wurde eine Hydrolysenmethode gesucht, die neben einer verlustlosen Freilegung der Purinbasen auch ihre vollständige und saubere Trennung vom Resthydrolysat erlaubt. Es wurden dazu zunächst bekannte Methoden einer kritischen Betrachtung unterzogen.

Die Isolierung der Purinbasen als Silbersalze durch Fällung mit Silbernitrat ist im Gegensatz zu Literaturangaben (z.B. Lit.14) nur in saurer Lösung vollständig. Zur Eluierung der Basen aus dem Niederschlag wird dieser mit KCN-Lösung aufgenommen und die Silberionen mit einem Überschuß an HCl aus der Lösung entfernt. Es können noch sehr geringe Mengen erfaßt werden. Leider versagte die Methode bei der Übertragung auf Polynucleotid-hydrolysate, weil sich höhermolekulare Begleitstoffe im Silberniederschlag ansammeln und so die polarographische Adeninbestimmung stören.

Bessere Ergebnisse brachte die Isolierung der Purinbasen als Hydrochloride auf Grund ihrer Schwerlöslichkeit in mit HCl gesättigtem Methanol bzw. Äthanol. P.A.Levene benutzte die Methode wohl als erster, sie wurde seitdem häufig modifiziert. Zur Hydrolyse wird im allgemeinen ein Gemisch von Polynucleotid und Methanol unter Einleiten von HCl eine gewisse Zeit am Rückfluß gekocht. Dabei bleiben die Purine im Rückstand, während der Rest in Lösung geht.

Nach vielen Versuchen fanden wir, daß eine Hydrolyse im Mikrobombenrohr mit HCl-gesättigtem Äthanol bei 100° bei kleinen Einwagen (etwa 50 - 100 mg) die besten Ergebnisse liefert. Die Löslichkeit der Purinhydrochloride in Äthanol-HCl ist sehr gering, die Reinheit der anfallenden Purinhydrochloride ist, wie an der fast ungedämpften Adeninkurve festzustellen war, sehr gut. Die Bildungsgeschwindigkeit von Äthylchlorid, das während der Hydrolyse entsteht, ist bei gleichen Bedingungen viel kleiner als die von Methylchlorid. Das ist wichtig, weil bei Hydrolyse mit Methanol HCl bei 100° das Methylchlorid über dem Hydrolysat eine Schicht bildete, wodurch beim Öffnen des Rohres häufig ein Teil des Inhalts verspritzte. Daher ergab sich bei dieser Arbeitsweise die höchste Ausbeute an Purinen.

Beachtenswert ist es, daß im Gegensatz zur üblichen Ansicht das Guaninhydrochlorid in fast allen von uns untersuchten mit HCl gesättigten Lösungsmitteln etwa 5-10 mal mehr löslich ist als Adeninhydrochlorid.

Die Übertragung der Methode auf sehr kleine Einwaagen (2-10 mg) gelang nur teilweise. Da aus technischen Gründen mit der Verringerung der Einwaage eine solche der Hydrolysen- und Waschflüssigkeit nicht mehr möglich ist, macht sich dann die Löslichkeit der Purinhydrochloride störend bemerkbar. Zur Bestimmung der Purinbasen sollte man daher zwischen 50 und 100 mg Polynucleotid für die Hydrolyse zur Einwaage bringen und nur in Notfällen mit Einwaagen von etwa 20 mg arbeiten.

Die genaue Beschreibung der Methodik ist Abschnitt II 3 zu entnehmen.

Zur Freilegung der Pyrimidinbasen wird das Filtrat von den Purinbasen vom Lösungsmittel und HCl befreit und mit wenig 100%iger Ameisensäure im Bombenrohr bei 175° aufgeschlossen. Dadurch werden die Pyrimidinbasen aus den Kohlehydrat-Phosphorsäure-Komplexen in Freiheit gesetzt. Die Weiterverarbeitung erfolgt, wie vorher beschrieben.

3.) Zusammenfassende Beschreibung des Analysenganges.

50-100 mg Polynucleotid werden in einem Mikrobombenrohr (Länge 200 mm, Durchmesser 8 mm) mit 0,5 ccm absolut äthanolischer Salzsäure nach Zuschmelzen 50 Min. in einem siedenden Wasserbad bei gelegentlichem Durchschütteln hydrolysiert. Dann läßt man 12 Std. zur völligen Abscheidung der Purin-hydrochloride bei 0° stehen und überführt auf eine Mikroglasfritte. Das Bombenrohr wird noch 4 mal mit je 0,5 ccm Äthanol-HCl und noch einige Male mit absolutem Äther nachgewaschen.

Zur Bestimmung der Purinbasen löst man den Niederschlag der Purinhydrochloride in einem ccm 0,1 n HCl, saugt ab, spült einige Male mit Wasser nach und überführt das Filtrat in ein 25 ccm Meßkölbchen, das man zur Marke auffüllt. In einem aliquoten Teil wird Adenin polarographisch und Guanin nach der auf S.4 beschriebenen U.V.-Differenzmethode bestimmt.

Zur Bestimmung der Pyrimidinbasen und der Phosphorsäure wird das Filtrat von den Purin-hydrochloriden zunächst bei normalem Druck, schließlich im Vakuum zur Trockne gedampft (auf dem Wasserbad). Der Rückstand wird mit insgesamt 3-4 ccm absoluter Ameisensäure in ein Halbmikrobombenrohr überführt. Durch 2-stündiges Erhitzen auf 170-175° in einem Eisenmantel im Ölbad werden die Pyrimidinbasen freigelegt. Nach Erkalten und Öffnen des Rohres wird der Inhalt bis zur Syrupkonsistenz eingedampft. Je nach dem, ob die Dioxypyrimidine von den Oxyaminopyrimidinen getrennt werden sollen oder nicht, wird nach b) oder a) weiterbehandelt.

a.) Der Rückstand wird mit 2 ccm 1n H_2SO_4 nach Zuschmelzen des Bombenrohres 2 Tage im Ölbad auf 140° erhitzt (Desaminierung!). Dann wird der Inhalt mit heißem Wasser vollständig in einem 25 ccm Erlenmeyer überführt und im Trockenschrank bei 110° eingedampft. Der glasige Rückstand wird mit 5 ccm HNO_3 der Dichte 1,25 versetzt und zur Lösung von Zeit zu Zeit umgeschüttelt. Dann wird die überschüssige Salpetersäure in einem Vakuumexsikkator an einer gut ziehenden Wasserstrahlpumpe abgedampft. Wenn die Hauptmenge verdampft ist (2 Stdn.), wird eine Schale mit Ätznatron in den Exsikkator gebracht, von dem die Reste der HNO_3 über Nacht aufgenommen werden. Nach Wiederholung der Nitrierung mit 2 ccm der HNO_3 in gleicher Weise wird der Rückstand in Wasser gelöst und im Meßkölbchen auf 25 ccm gebracht. In einem Teil werden die Pyrimidinbasen nebeneinander, in einem anderen die Phosphorsäure wie beschrieben bestimmt.

b) Etwa 200 - 400 mg "Tonsil-Standart" werden mit einigen Tropfen Wasser zu einem dünnen Brei angerührt und in einem Filterrohr (Glasfritte G 3, Durchmesser 1 cm, Höhe 2 cm) so abgesaugt, daß die Oberfläche des Adsorptionsmittels gerade trocken ist. Der oben erhaltene Rückstand wird nun in einigen ccm Wasser gelöst und durch das Adsorptionsmittel filtriert, das mit einigen ccm Wasser nachgewaschen wird. Das Filtrat wird zur Trockne gedampft und im Rückstand wie bei a) Thymin und Uracil bestimmt.

Das Zytosin und Methylzytosin enthaltende Adsorptionsmittel wird nach Trocknung vollständig in ein Mikrobombenrohr überführt und zur Desaminierung mit 0,5 ccm mit SO_2-gesättigter 20%iger Schwefelsäure 24 Std. auf 170-175° erhitzt. Dann wird der Inhalt in ein 50 ccm Becherglas überführt und in der Siedehitze so lange mit zu einem Brei angerührten Bariumcarbonat versetzt, bis p_H 7 erreicht ist, dann filtriert und eingedampft. Im Rückstand wird Zytosin und Methylzytosin, die in Uracil und Thymin übergegangen sind, wie bei a) bestimmt.

III. Die Zusammensetzung von Desoxyribonucleinsäure aus Kalbstymus.

Die Zusammensetzung von Desoxyribonucleinsäure aus Kalbstymus, ermittelt nach der in dieser Arbeit angegebenen Methodik, ist aus der folgenden Tabelle zu ersehen (Nr.8). Die Zahlen stellen Durchschnittswerte aus mehreren Analysen dar. Zur Analyse wurde ein Präparat gebracht, das nach einer Vorschrift von F.G.Fischer hergestellt wurde (Lit.11). Die von uns gefundenen Basengehalte sind, wie schon aus den hohen Basenausbeuten hervorgeht, den wirkl.

Gehalten nahe. Die Ergebnisse zeigen mit aller Deutlichkeit, daß die Basen nicht im Verhältnis kleiner ganzer Zahlen in der untersuchten Nucleinsäure enthalten sind. Die Annahme wiederkehrender, aus den Basen sich regelmäßig aufbauender Perioden hat also keine Wahrscheinlichkeit für sich. Zudem haben neuere, 1953 erschienene Veröffentlichungen (Lit.2,8) dargelegt, daß sich Desoxyribonucleinsäure aus Kalbstymus in Fraktionen verschiedener Zusammensetzung aufteilen läßt. Es bleibt noch zu untersuchen, ob in solchen Polynucleotidfraktionen einfache Basenverhältnisse gefunden werden können.

In der Tabelle sind außer den eigenen Analysen die wichtigsten Ergebnisse anderer Autoren angeführt und in der folgenden Weise umgerechnet: Die Zahlen geben die molaren Verhältnisse der Basen wieder, bezogen auf den ermittelten Phosphorgehalt = 400.

Bei Vergleich der von uns gefundenen Werte mit denen anderer Autoren zeigte sich, daß 1. das Verhältnis der Purinbasen zu den Pyrimidinbasen deutlich zu Gunsten der Purinbasen verschoben und 2., daß das Verhältnis Adenin zu Guanin zu Gunsten des Guanins verschoben ist. Der Grund dafür ist die Art unserer Hydrolyse, bei der die gegenüber den Pyrimidinbasen relativ empfindlichen Purinbasen sehr schonend und vollständig freigelegt und isoliert werden. Eine Ausnahme in Bezug auf Punkt 1 bilden die Analysen H. Steudels und die ersten Analysen E.Chargaffs sowie Analysen von F.G.Fischer und H.Mangold, die im hiesigen Institut ausgeführt wurden. Bemerkenswert ist es, daß wir in unserem Präparat eine gewisse Menge Uracil fanden. In Lit. wird das Vorkommen einer geringen Menge Methylzytosin beschrieben, dessen Vorkommen auch von E.Chargaff und anderen Autoren bestätigt wird (Lit.1,8,9,24, 25,26).

Verhältnis der Basen in Thymonucleinsäurepräparaten.

Nr.	Literatur	Adenin	Guanin	Zytosin	Thymin	Methyl-zytosin	Uracil	Basen-ausbeute	Purine / Pyrimidine
1	Nr.22	111,0	94,0	53,5	94,4	-	-	88,2	1,385
2	Nr.28	96,8	75,3	78,3	97,2	5,2	-	88	0,962
3	Nr.19	112	80	80	112	-	-	96	1,00
4	Nr. 7	115	76	66	103	-	-	90	1,13
		106	83	66	100	-	-	88,8	1,14
		114	95	72	94	-	-	93,8	1,26
		98	79	61	94	-	-	83	1,14
		104	82	69	97	-	-	88	1,12
5	Nr. 5	116	84,8	84,8	114	-	-	-	1,01
6	Nr.17	100	72,6	66	88,8	-	-	84,5	1,12
7	eig.Anal.n. Lit.Nr.	103	91,3	-	98,3	-	-	-	-
8	eig.Anal.	111,1	105	53,3	97,8	-	18,8	96,6	1,20

IV. Literaturverzeichnis

1. G.BRAVERMAN, E.CHARGAFF, J.Am.chem.Soc. 73, 4052 (1951)
2. G.B.BROWN, M.WATSON, Nature 172, 339 (1953)
3. J.G.BUCHANAN, C.A.DEKKER, H.G.LONG, J.chem.Soc. 1950, 3165
4. P.BOULANGER, J.MONTREUIL, Bull.soc.chim.biol. 33, 784 (1951)
5. E.CHARGAFF, C.F.CRAMPTON, R.LIPSCHITZ, J.biol.chem.192,223 (1951)
6. E.CHARGAFF, C.F.CRAMPTON, R.LIPSCHITZ, Nature 172, 289 (1953)
7. E.CHARGAFF, E.VISCHER, R.DONIGER, C.GREEN, G.MISANA, J.biol. chem. 177, 405 (1949)
8. W.E.COHN, J.Am.chem.Soc. 73, 1539 (1951)
9. C.A.DEKKER, D.T.ELMORE, J.chem.Soc. 1951, 2864
10. J.E.EDSTRÖM, Nature 168, 876 (1951)
11. F.G.FISCHER, H.LEHMANN-ECHTERNACHT, H.S. 278, 143 (1943)
12. E.FORCHE, Mikrochemie 25 (38) 217-24
13. N.FRIES, Chem.Abstr. 43, 8460 (1949)
14. KERR, SERAIDMAN, WARGON, J.biol.chem. 181, 716 (1950)
15. J.M.KOLTHOFF, H.A.LAITINEN, Science 92, 152-54 (1940) J.phys.chem. 45, 1579-93 (1941)
16. P.A.LEVENE, J.A.MANDEL, Bio.Z. 10, 215 (1908)
17. H.MANGOLD, Diss. Würzburg 1951
18. R.MARKHAM, J.D.SMITH, Nature 163, 250 (1949)
19. H.MARSHAK, H.V.VOGEL, J.biol.chem. 189, 597 (1951)
20. F.MIESCHER, H.S. 1871, 441
21. R.M.REGUERA, I.ASIMOV, J.Am.chem.Soc. 72, 5781 (1950)
22. H.STEUDEL, H.S. 49, 406 (1906)
23. A.STERN, Ind.eng.chem.,anal.Ed. 14, 74 (1942)
24. A.R.TODD, Ang.Chem. 65, 12 (1953)
25. F.A.UHL, Z.anal.Chem. 110, 102 (1937)
26. G.R.WYATT, Biochem J. 48, 584 (1951)
27. G.R.WYATT, Nature 166, 237 (1950)
28. G.R.WYATT, R.MARKHAM, Biochem.J. 48, 581 (1950)
29. J.S.WALL, Anal.chem. 25, 950 (1953)
30. E.VISCHER, E.CHARGAFF, J.biol.Chem. 168, 781 (1947)

RUDOLF BAEHR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG KOLOFFSTEINSTR. 5